



Encuentro  
de JÓVENES  
INVESTIGADORES

## EVALUACIÓN DE MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE SISTEMAS MICELARES DE TWEEN 80 QUE ENCAPSULAN ACEITES ESENCIALES

Delmonte, Agustina<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina, CONICET.

<sup>2</sup>Área de Biocoloides y Nanotecnología, Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, 1 de Mayo 3250, Santa Fe (3000), Argentina.

Director: Dr. Perez, Adrián

Codirectora: Dra. Visentini, Flavia

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Sistemas micelares, Tween 80, Aceites esenciales.

### INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales (AEs) se caracterizan por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiinflamatorias, anticancerígenas y antioxidantes, por lo que podrían ser utilizados como alternativa a tratamientos farmacológicos (Tariq y col., 2019). Su directa incorporación en la formulación de productos presenta una serie de inconvenientes asociados a su hidrofobicidad, volatilidad y susceptibilidad al oxígeno y la luz (Delshadi y col., 2020). Para sortear estos inconvenientes, los AEs deben ser encapsulados.

Diferentes métodos de encapsulación han sido estudiados, destacándose los sistemas micelares (SMs) por su originalidad y versatilidad. Los SMs se definen como sistemas formados por agua, aceite y, por lo menos un compuesto tensioactivo, que se presentan formando una solución líquida simple, ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable. En principio, se forman espontáneamente cuando los ingredientes adecuados se mezclan en condiciones óptimas sin requerir excesiva energía mecánica. Sin embargo, en la práctica a menudo es necesario aplicar algún tipo de procesamiento (McClements, 2015). Una de las ventajas de los SMs es que su tamaño nanométrico (10-100nm) permite su incorporación en la formulación de diversos productos sin comprometer sus propiedades fisicoquímicas (Lesmes & McClements, 2009).

La inocuidad de los SMs es el punto más importante a considerar para su aplicación en la industria farmacéutica y/o alimenticia. En este sentido, se prefieren los tensioactivos no iónicos por su baja toxicidad e irritabilidad (ej. los polisorbatos o Tweens) (Chatzidaki y col., 2019). Por otro lado, los cotensioactivos más utilizados son los alcoholes alifáticos (ej. etanol, isopropanol, etc.) y los polioles (ej. glicerol, polietilenglicol, etc.) ya que incrementan la flexibilidad y movilidad de la película interfacial, disminuyen la energía de enlace y regulan el balance hidrofílico-lipofílico, favoreciendo la obtención de SMs (Fanun, 2008).

### OBJETIVOS

- Evaluar dos métodos de obtención de SMs como nanoestructuras capaces de encapsular AE de orégano (AEO) y AE de tomillo (AET). El primer método consiste en la obtención de SMs con un proceso que involucra baja energía mecánica (SMs-1) y el segundo en el desarrollo de SMs con un proceso basado en alta energía mecánica (SMs-2).
- Estudiar el tamaño de partícula y la eficiencia de encapsulación de SMs-1 y SMs-2.

Título del proyecto: Impacto de la matriz alimentaria y la nanoencapsulación sobre la bioaccesibilidad y actividad antidiabética de compuestos bioactivos.

Instrumento: PICT.

Año convocatoria: 2017.

Organismo financiador: ANPCyT.

Directora: MSc. Liliana Gabriela Santiago.

- Evaluar y comparar la estabilidad de los SMs durante 30 días de almacenamiento.
- Analizar la morfología y la capacidad de solubilización de los SMs.

## METODOLOGÍA

### Obtención de SMs por el método basado en baja energía mecánica

Para la obtención de SMs-1 se añadieron 0,4g de una solución de AE en etanol (50% p/p) a soluciones acuosas con cantidades variables de Tween 80, dando lugar a relaciones de Tween80/AE (SOR) de 0,05 a 1 p/p. Luego, las muestras se agitaron en vortex por 30s y se almacenaron a temperatura ambiente (Sedaghat Doost y col., 2020).

### Obtención de SMs por el método basado en alta energía mecánica

Para la obtención de SMs-2 se preparó una pre-emulsión con AE (5% p/p), etanol (5% p/p) y Tween 80 (2,5% p/p), y se homogeneizó a 15000 rpm durante 5 min, usando un agitador de alta velocidad. Luego se titularon alícuotas de la pre-emulsión en soluciones de Tween 80 (1% p/p) para obtener SMs-2 con un rango de concentración final de AE de 0,0125 a 3% p/p (Rao & McClements, 2012).

### Solubilización de AEO y AET en micelas de Tween 80

Luego de 24hs de almacenamiento a temperatura ambiente (25°C), se determinó la turbidez de SMs-2 a 600nm por espectrofotometría. La capacidad máxima de solubilización ( $C_{sat}$ ) de AE en las micelas de Tween 80 se definió como la concentración de AE donde se interceptan dos líneas rectas trazadas a partir de los datos de concentraciones de aceite relativamente bajas y altas (Rao & McClements, 2012). Esta determinación no pudo hacerse para SMs-1 debido a la heterogeneidad de los sistemas.

### Tamaño de partícula

La distribución de tamaño de partícula (PSD) se obtuvo mediante dispersión de luz dinámica (DLS) empleando un equipo Zetasizer Nano ZS90. El diámetro hidrodinámico ( $d_H$ ) se obtuvo de la curva Intensidad (%) vs diámetro (nm). El tamaño de partícula se evaluó a los días 1, 7, 14 y 30 de almacenamiento a temperatura ambiente (25°C).

### Eficiencia de encapsulación (EE)

En primer lugar, se realizó una curva estándar de AE en n-hexano. Luego, para determinar la EE se midió el AE libre y total. Para determinar AE libre se realizó una extracción con n-hexano y posterior medición de absorbancia por espectrofotometría a 281nm para AEO y 273nm para AET. Para determinar AE total, fue necesario romper la estructura micelar previamente, por lo tanto, los SMs se mezclaron con metanol y se agitó 10 s en vortex. Luego, se procedió de igual manera que para la determinación de AE libre. La EE se calculo con la siguiente ecuación

$$EE (\%) = \frac{AE\ Total - AE\ Libre}{AE\ Total} \times 100 \quad (Eq. 1)$$

La EE se estudió al día 1, 7, 14 y 30 de almacenamiento a temperatura ambiente (25°C).

### Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Alícuotas de cada muestra se adsorbieron a una superficie de mica (1 cm<sup>2</sup>) mediante un

secado en cámara de vacío a temperatura ambiente. La obtención de imágenes de AFM se realizó en modo “tapping” utilizando un microscopio Agilent 5400 (EE.UU.). Para procesar las imágenes se utilizó el software Gwyddion 2.44.

### Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se calcularon los promedios y las desviaciones estándar. Las diferencias estadísticas se determinaron a través del análisis de varianza unidireccional (ANOVA) utilizando el software Stat Graphics Plus 3.0. Para ello se aplicó la prueba Tukey HSD con un 95% de nivel de confianza.

## RESULTADOS

### Solubilización de AEO y AET en micelas de Tween 80

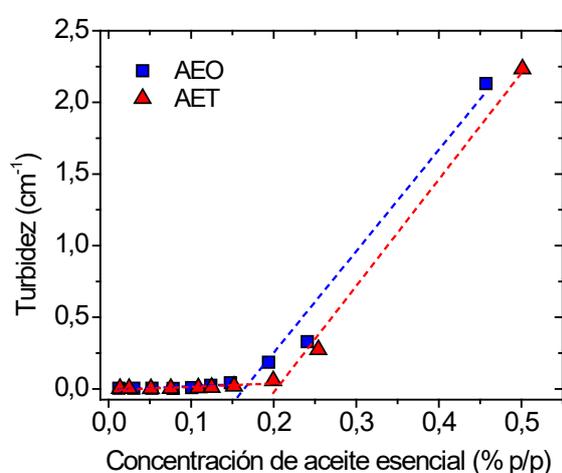


Figura 1. Determinación de C<sub>sat</sub>.

La capacidad máxima de solubilización (C<sub>sat</sub>, determinada a partir de la intersección de las dos rectas de la Figura 1) fue 0,17 ± 0,01% para AEO y 0,21 ± 0,01% para AET. Por debajo de la C<sub>sat</sub>, el AE probablemente fue solubilizado por las micelas de Tween 80, lo que resultó en valores bajos de turbidez y una apariencia translúcida. Por encima de la C<sub>sat</sub>, las micelas posiblemente estaban saturadas con AE, y el aceite remanente estaba disperso como gotas de AE, mostrando altos valores de turbidez y una apariencia turbia y opaca.

### Tamaño de partícula

Los SMS-1 que encapsularon AET presentaron un d<sub>H</sub> que osciló entre 28 y 59 nm a 1 día de almacenamiento, mientras que con AEO, el tamaño estuvo entre 24 y 68 nm. Por otro lado, para ambos AEs y para todos los SOR se produjo un aumento significativo de tamaño de partícula después de 30 días de almacenamiento (p<0.05).

Los SMS-2 al día 1 de almacenamiento presentaron un d<sub>H</sub> que osciló entre 8,5 y 12,4 nm para AET y entre 10,3 y 16,9 nm para AEO. Además, la mayoría de los SMS-2 cargados con AET se mantuvieron estables durante el almacenamiento. Por otro lado, para SMS-2 que encapsularon AEO, se observó que la mayoría de los sistemas no mostraron diferencias significativas en el tamaño de partícula durante 14 días de almacenamiento (p>0.05).

### Eficiencia de encapsulación

La EE de los SMS-1 varió ampliamente con el SOR. En el caso de SMS-1 cargados con AET, la EE más baja fue de 20% para SOR 0,5, y la más alta fue de 66% para SOR 0,1. Para SMS-1 cargados con AEO, la variabilidad fue menor y los valores de EE encontrados fueron mayores, entre 68 y 86%. Después de 30 días de almacenamiento la EE de SMS-1 permaneció igual (p>0.05) o disminuyó (p<0.05).

En cuanto a SMS-2 cargados con AET y AEO, se observaron valores de EE altos, alrededor del 88% en todas las concentraciones probadas a 1 día de almacenamiento. Después de 30 días de almacenamiento, se observó un aumento significativo en la EE de la mayoría de SMS-

2 que contenían AET ( $p < 0,05$ ). Mientras que la mayoría de los SMs-2 que contenían AEO no mostraron diferencias significativas en la EE durante el tiempo de almacenamiento ( $p > 0,05$ ).

### Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Las imágenes topográficas de AFM de SMs-1 cargados con AEO y AET mostraron partículas redondeadas con gran heterogeneidad, aglomeración y tamaño variable. Por el contrario, en el caso de los SMs-2 cargados con AEO y AET, se observaron partículas de menor tamaño, distribución homogénea y forma esférica.

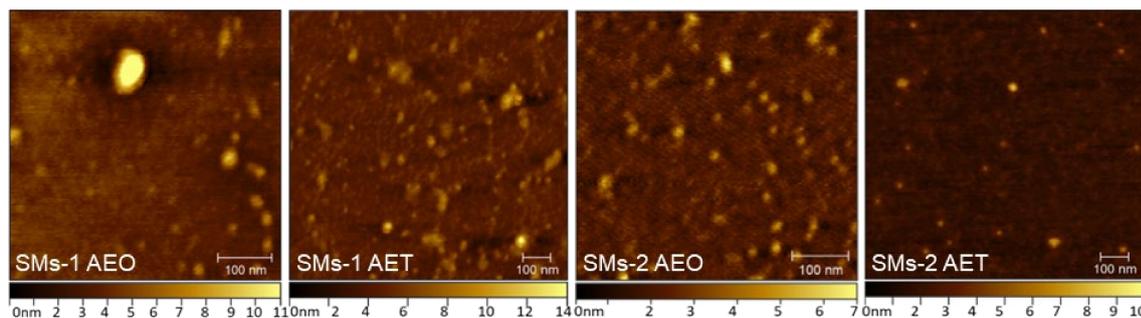


Figura 2. Imágenes topográficas de microscopía de fuerza atómica (AFM).

### CONCLUSIONES

Como conclusión, el método que aplica alta energía mecánica resultó ser el más eficiente en términos de tamaño de partícula, estabilidad en el tiempo y encapsulación de AE. Este método permitió obtener SMs estables de forma fácil, rápida y con equipos altamente disponibles en la industria. Por lo tanto, los SMs-2 constituyen una alternativa prometedora para la encapsulación de AEO y AET con el fin de explotar sus propiedades bioactivas para futuras aplicaciones farmacéuticas y alimentarias.

### BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Chatzidaki, M. D., Papadimitriou, V., & Xenakis, A.** (2019). Encapsulation of food ingredients by microemulsions. *Lipid-Based Nanostructures for Food Encapsulation Purposes: Volume 2 in the Nanoencapsulation in the Food Industry series*. Elsevier Inc.
- Coimbra, A., Ferreira, S., & Duarte, A. P.** (2022). Biological properties of *Thymus zygis* essential oil with emphasis on antimicrobial activity and food application. *Food Chemistry*, 393, 133370.
- Delshadi, R., Bahrami, A., Tafti, A. G., Barba, F. J., & Williams, L. L.** (2020). Micro and nano-encapsulation of vegetable and essential oils to develop functional food products with improved nutritional profiles. *Trends in Food Science and Technology*, 104(July), 72–83.
- Fanun, M.** (2008). Phase behavior, transport, diffusion and structural parameters of nonionic surfactants microemulsions. *Journal of Molecular Liquids*, 139(1–3), 14–22.
- Lesmes, U., & McClements, D. J.** (2009). Structure-function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery systems. *Trends in Food Sci. Technol.*, 20(10), 448–457.
- McClements, D. J.** (2015). *Surfactant-Based Delivery Systems Nanoparticle and Microparticle based delivery systems*. CRC Press; Taylor & Francis Group., 149–190.
- Rao, J., & McClements, D. J.** (2012). Lemon oil solubilization in mixed surfactant solutions: Rationalizing microemulsion & nanoemulsion formation. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 268–276.
- Sedaghat Doost, A., Devlieghere, F., Stevens, C. V., Claeys, M., & Van der Meer, P.** (2020). Self-assembly of Tween 80 micelles as nanocargos for oregano and trans-cinnamaldehyde plant-derived compounds. *Food Chemistry*, 327(October 2019), 126970.
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., Shalla, A. H., & Rather, M. A.** (2019). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 134(June), 103580.